

本文引用:李海霞,张勇华,任晓丹,孟欣茹,周娟娟,王轻轻,何芳,罗银河.建立RSV联合OVA诱发幼年大鼠哮喘模型的方法[J].湖南中医药大学学报,2018,38(12):1371-1373.

## 建立RSV联合OVA诱发幼年大鼠哮喘模型的方法

李海霞<sup>1,2</sup>,张勇华<sup>1</sup>,任晓丹<sup>1</sup>,孟欣茹<sup>1</sup>,周娟娟<sup>1</sup>,王轻轻<sup>1</sup>,何芳<sup>1\*</sup>,罗银河<sup>3\*</sup>

(1.河北省中医院,河北 石家庄 050011;2.湖南省儿童医院,湖南 长沙 410006;3.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

**〔摘要〕**目的 探讨呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)滴鼻联合卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)雾化方法,建立大鼠哮喘模型的可行性。**方法** 将SD大鼠共30只随机分为正常对照组(A组)、哮喘模型组(B组)和地塞米松组(C组)3组,每组10只,分别给予相应干预,两周后观察大鼠反应,应用肺功能测量仪测定气道阻力(Re值)、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞计数与分类,并观察肺组织病理改变。**结果** A组大鼠反应及Re值基本正常,B组大鼠出现喘息表现,且测Re值明显高于A组( $P<0.05$ ),C组大鼠较B组有所减轻;与A组比较,B组、C组BALF中白细胞计数显著升高( $P<0.01$ ),以嗜酸性粒细胞比例为主( $P<0.01$ ),C组较B组BALF中白细胞计数、嗜酸性粒细胞比例显著下降( $P<0.01$ );肺组织病理A组支气管肺泡结构基本正常,B组可见支气管结构紊乱、管壁增厚以及炎性细胞浸润等,C组较B组有所减轻。**结论** RSV联合OVA诱发方法,能够成功建立幼年大鼠哮喘模型,为进一步实验研究奠定基础。

**〔关键词〕** 哮喘;动物模型;联合诱发;呼吸道合胞病毒;卵清蛋白

**〔中图分类号〕** R965.1;R562.2\*5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.12.004

### A Method for Establishing Young Rat Model of Asthma Induced by Respiratory Syncytial Virus Combined with Ovalbumin

LI Haixia<sup>1,2</sup>, ZHANG Yonghua<sup>1</sup>, REN Xiaodan<sup>1</sup>, MENG Xinru<sup>1</sup>, ZHOU Juanjuan<sup>1</sup>, WANG Qingqing<sup>1</sup>, HE Fang<sup>1\*</sup>, LUO Yinhe<sup>3\*</sup>

(1. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 2. Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410006, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the feasibility of intranasal delivery of respiratory syncytial virus (RSV) with ovalbumin (OVA) atomization to establish a rat model of asthma. **Methods** A total of 30 Sprague-Dawley rats were equally and randomly divided into group A (normal control group), group B (asthma model group), and group C (dexamethasone group) to receive respective treatments. After two weeks, the reaction of rats was observed. Airway resistance (Re value) was determined using a pulmonary function meter. Cell counting and classification were performed for bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The pathological changes of lung tissue were evaluated. **Results** Group A exhibited basically normal reaction and Re value, and group B showed wheezing and a significantly higher Re value than group A ( $P<0.05$ ); group C showed improvements than group B. Compared with group A, group B and group C had significantly increased leukocyte count in BALF ( $P<0.01$ ), mainly dominated by eosinophils ( $P<0.01$ ). Compared with group B, group C exhibited significantly reduced leukocyte count and eosinophil percentage in BALF ( $P<0.01$ ). Pathology of lung tissue revealed that group A had basically normal bronchoalveolar structure, group B showed disorder of bronchial structure, bronchial wall thickening, and inflammatory cell infiltration, and group C showed alleviation compared with group B. **Conclusion** The young rat model of asthma can be established by RSV combined with OVA, which lays a foundation for further experimental study.

**〔Keywords〕** asthma; animal model; jointly induced; respiratory syncytial virus; ovalbumin

**〔收稿日期〕** 2018-01-24

**〔基金项目〕** 河北省重点研发计划项目(17277713D);湖南省自然科学基金项目(2015JJ2016)。

**〔作者简介〕** 李海霞,女,博士,主治医师,研究方向:中医药治疗小儿呼吸系统疾病。

**〔通讯作者〕** \*何芳,女,副主任医师,E-mail:459881218@qq.com;罗银河,女,副教授,硕士研究生导师,E-mail:1286313109@qq.com。

支气管哮喘(以下简称哮喘),作为小儿常见的呼吸系统疾病,不仅严重威胁了儿童的身心健康,也给家庭与社会带来了巨大压力。研究发现<sup>[1-2]</sup>,大多数婴幼儿均感染过呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)<sup>[3-4]</sup>。RSV感染与日后发生反复喘息甚至哮喘密切相关。气道重塑是哮喘发病的重要病理特征,其过程有多种细胞因子参与,如转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)和白介素-13(IL-13)等,既能反映气道炎症,又可参与气道重塑,在哮喘的发生、发展过程中发挥着重要作用<sup>[5-6]</sup>。目前很多学者从基础和临床方面进行哮喘的相关研究<sup>[7-8]</sup>。因而,本文研究建立RSV感染动物哮喘气道重塑模型,可为今后临床研究奠定一定的基础,具体方法如下。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SD大鼠30只,约3~4周龄,体质量为(45±15)g,许可证号:SCXK(湘)2013-0005。饲养于SPF级动物房。室温22~24℃,湿度50%~55%。

### 1.2 实验试剂

乙酰胆碱(Ach),上海伊卡生物技术有限公司;RSV由武汉大学医学部病毒研究所提供;卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)购自美国Sigma公司。

### 1.3 实验仪器

KYWH1004超声雾化器(佛山市凯亚医疗科技有限公司);HE-100E小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);TG-16WS台式高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);肺功能测量仪(国产FL998BC)。

## 2 方法

### 2.1 分组

将大鼠30只随机分为正常对照组(A组)、哮喘模型组(B组)、地塞米松组(C组),每组10只。

### 2.2 造模

参照文献<sup>[9]</sup>中方法,将B、C组于实验第1、2天均以RSV鼻腔滴入25  $\mu$ L,并于背部、双下肢外侧以10%OVA皮下注射,共0.25 mL。A组大鼠以同等剂量Hep-2细胞滴鼻,同部位同体积予生理盐水皮下注射;自实验第9天起,B、C组均予以1%OVA雾化吸入激发0.5 h/次,隔日1次,持续2周。A组以生理盐水雾化作为对照。C组于激发前0.5 h予地塞米松生理盐水溶液灌胃,每日1次,持续2周。A、B组予生理盐水灌胃。

### 2.3 取材

末次灌胃2 h后,麻醉,以不同浓度的Ach应

用肺功能测量仪测定气道反应性后,分离肺叶留作灌洗,并取出支气管及左肺,PBS冲洗后放入4%多聚甲醛中固定,密闭保存。固定24 h后备用。

### 2.4 指标检测

2.4.1 大鼠反应及形态变化 观察并记录大鼠呼吸、毛色、口唇颜色、反应、动作,以及后期质量、毛发、精神状态等。

2.4.2 气道反应性测定 大鼠麻醉后,用剪刀V型剪开气管,将深静脉穿刺针进行气管插管,插入约3~4 cm后固定。找到颈静脉,穿入留置针并固定;接小动物呼吸机,设置呼吸频率75次/min,吸呼比为1:1,潮气量为8 mL/kg,连接肺功能测量仪;推入生理盐水0.5 mL,记录气道阻力(Re值);再由低浓度至高浓度依次注入Ach各0.5 mL,并分别记录测定的Re值,间隔约3~4 min/次。

2.4.3 支气管灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞计数及分类 分离右侧支气管及肺叶进行灌洗,抽取回收液约5~6 mL,离心,倒出液体,沉渣用1 mL PBS液重悬。取10  $\mu$ L重悬液稀释到1 mL PBS里,取10  $\mu$ L稀释液,计数板计数,制备细胞涂片,光镜下将白细胞作细胞分类计数,重复3次,取其平均值,并求百分比。

2.4.4 肺组织病理观察 收集BALF完成后立刻分离并取出左支气管及肺叶,经洗涤、梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、HE染色,在200倍光镜下观察,随机选取3~4个形态规整的支气管横断面,直径约100~200  $\mu$ m进行观察。

### 2.5 统计学方法

所有数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用SPSS 20.0软件。多组间多个样本均数的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 大鼠反应及形态变化

A组大鼠未见异常反应;B组大鼠可见有点头样喘息、口唇紫绀、烦躁、易激惹、搔鼻、弓肩耸肩、抓耳等表现。反复激发后,体质量增长缓慢,毛发欠光泽,精神差;C组大鼠喘息等相关症状较B组减轻。

### 3.2 大鼠气道反应性

各组大鼠Re值基础水平(生理盐水)差异无统计学意义( $P=0.091$ ),但其Re值随Ach浓度升高而增加,予浓度为15  $\mu$ g/kg的Ach激发,其Re值结果发现B组比A组增加明显( $P=0.038$ );当以浓度为30~120  $\mu$ g/kg的Ach激发后,结果发现B组大鼠Re值较A组比较显著增加( $P=0.000$ )。见表1。

表 1 不同 Ach 浓度大鼠气道反应性 Re 值比较

组别	Ach 浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )				
	0	15	30	60	120
A 组	5.08±0.65	5.00±0.21	7.27±0.55	9.69±0.99	10.43±0.38
B 组	5.10±0.34	6.68±0.42*	9.84±0.68**	23.27±3.12**	38.93±4.23**
C 组	5.09±0.26	6.22±0.35	8.56±0.21	19.85±2.03*	24.37±2.68**

注:与 A 组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 B 组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

### 3.3 BALF 中细胞计数及分类

B、C 组较 A 组白细胞总数显著增多 ( $P<0.01$ ), C 组较 B 组有所下降,差异具有显著意义 ( $P<0.01$ )。从细胞分类上看,发现 B、C 组较 A 组结果嗜酸性粒细胞百分比增加显著 ( $P<0.01$ ),B 组与 A 组比较,中性粒细胞百分比升高 ( $P<0.05$ ),而淋巴细胞百分比增高不明显 ( $P>0.05$ );与 B 组比较,C 组嗜酸性粒细胞百分比显著下降 ( $P<0.01$ ),中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比无明显变化 ( $P>0.05$ )。见表 2。

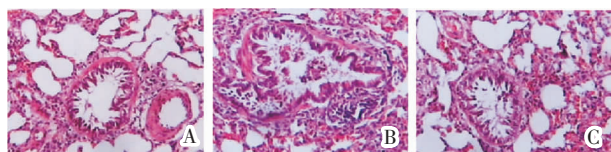
表 2 大鼠 BALF 中细胞计数与分类比较 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	白细胞总数 /( $\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$ )	细胞分类百分比/%		
		嗜酸性粒细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
A 组	11.99±4.01	4.01±0.43	15.98±3.02	20.01±1.99
B 组	60.03±5.89**	17.54±1.87**	19.98±2.88*	19.90±2.00
C 组	19.22±6.11***	9.97±1.86***	19.56±4.01	19.96±2.03

注:与 A 组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 B 组比较,## $P<0.01$

### 3.4 肺组织病理变化

镜下可见,A 组支气管及肺泡结构基本正常;B 组支气管、肺泡结构紊乱,气道上皮细胞坏死、脱落;气管腔内有大量炎性细胞浸润;管壁增厚、管腔狭窄,可见黏液栓形成,黏膜下基质可见较多胶原样物质沉积。C 组与 B 组比较,可见支气管管壁无明显增厚、管腔尚规则、上皮有少量炎性细胞浸润,气道平滑肌轻度增厚。见图 1。



注:A、B、C 分别为正常对照组、哮喘模型组、地塞米松组

图 1 各组支气管及肺泡光镜图(HE $\times 200$ )

## 4 讨论

气道重塑是 1922 年最早由 HUBER 和 KOESSLER

发现<sup>[10]</sup>,其病理特征包括:支气管管壁增厚、基底膜胶原蛋白沉积,气道平滑肌肥大,成纤维细胞增殖及黏液腺杯状细胞化生及增生等。其结果是产生持续的气道高反应性和不可逆性气道狭窄而成为哮喘迁延反复的病理基础。因此,运用合适的方式建立动物哮喘气道重塑模型对于今后研究临床药物治疗具有重要意义<sup>[11]</sup>。本实验建立哮喘气道重塑模型,经过各方面比较,提示运用 RSV 感染合并 OVA 致敏激发的方法建立 SD 大鼠哮喘模型具有可操作性,其病理形态学符合气道重塑的特点。且应用 RSV 活病毒感染与临床上 RSV 感染和哮喘发病密切相关的实际接近,并符合临床 RSV 诱发哮喘的发病的病理生理特征。因此,此方法能够建立一种较理想的大鼠哮喘气道重塑模型,可为进一步研究中医药干预哮喘发病环节及机制奠定基础。

### 参考文献:

- [1] BASEDOVSKY H O, SORKIN E. Network of immune-neuro-endocrine interactions[J]. Chin Exp Immunol, 1977,27(1):1-12.
- [2] CHESNOKOVA V, MELMED S, MINIREVIEW. Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules[J]. Endocrinology, 2002,143(5):1571-1574.
- [3] DOMACHOWSKY J B, ROSENBERG H F. Respiratory syncytial virus infection:immune response,immunopathogenesis,and treatment [J]. Clin Microbiol Rev,1999,12(2):298-309.
- [4] GLEZEN W P, TABER L H, TABER L H, et al. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus[J]. Am J Dis Child, 1986,140(6):543-546.
- [5] LAITINEN L A, HEINO M, LAITINEN A, et al. Damage of the epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma[J]. Am Rev Respir Dis, 1985,131(4):599-606.
- [6] DUNNILL M, MASSARSLLA G, ANDERSON J. Comparison of the quantitative anatomy of the bronchial in normal subjects, in status asthmatics, in chronic bronchitis, and in emphysema[J]. Thorax, 1969,24(2):176-179.
- [7] 邓桂明,蒋司晨,肖小芹,等.咳嗽穴位敷贴对哮喘大鼠肺组织 JAK1、STAT6 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):514-518.
- [8] 孔庆活,唐兴荣,冯玉莲,等.小青龙汤加减对支气管哮喘慢性持续期患者 PEF 的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):530-532.
- [9] 童黄锦,范欣生,许惠琴,等.一种病毒性哮喘模型制作方法的建立及评价[J].西安交通大学学报(医学版),2008,39(3):349-352.
- [10] HUBER P, MENIF K, JOUNET P. Acute severe asthma in pediatric resuscitation. The French Study Group on Pediatric Resuscitation[J]. Arch Pediatr,1994,1(4):346-349.
- [11] 廖肇发.不同雾化吸入方式治疗哮喘的效果评价[J].湖南中医药大学学报,2016,36(A1):24-25.

(本文编辑 杨 瑛)